

VALIDASI METODE UJI KADAR SEDIAAN DIKLAZURIL SERBUK TUNGGAL DENGAN PELARUT SODIUM ASETAT TRIHIDRAT DALAM METANOL MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV/VIS

Maria Fatima Palupi, Siti Khomariyah, Emi Rusmiati, Nafisah Idrishanty, Eli Nugraha

Unit Uji Farmasetik dan Premiks

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340

Email: lupi_ima@yahoo.co.id

ABSTRAK

Validasi metode merupakan suatu keharusan dalam pengembangan metode untuk memastikan bahwa metode yang digunakan memberikan hasil yang valid. Tujuan pengkajian ini adalah melakukan validasi metode uji kadar sediaan diklazuril serbuk tunggal dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol. Parameter validasi yang diuji adalah presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, dan spesifisitas. Hasil presisi, akurasi, linearitas, spesifisitas dinyatakan memenuhi persyaratan jika: (1) untuk presisi nilai koefisien variasi (coefficient of variation/CV) pengujian $< CV$ Horwitz dari metode; (2) akurasi dinyatakan baik jika nilai *recovery* $< 5\%$ atau rentang perolehan kembali 90-107%; (3) nilai regresi linearitas (r) $> 0,99$; dan (4) dinyatakan spesifik apabila kromatogram hasil uji zat selain diklazuril berbeda dengan bentuk kromatogram diklazuril. Hasil uji presisi menunjukkan bahwa metode ini memberikan presisi yang baik dengan nilai CV yang didapatkan 3,06%. Penilaian akurasi ditentukan dengan mendapatkan selisih perolehan kembali (*recovery*) dan didapatkan nilai *recovery* 2,94%. Uji akurasi juga dilakukan dengan tiga konsentrasi *working* standar yang berbeda (5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm) dan didapatkan nilai perolehan kembali 97,69% serta CV 2,07%. Linearitas metode ini diperoleh nilai regresi 0,99. Hasil uji spesifikasi metode dengan menggunakan toltrazuril sebagai pengecoh, menunjukkan hasil kromatogram toltrazuril berbeda dengan diklazuril. Batas deteksi metode didapatkan 0,480 ppm dan batas kuantifikasi 1,601 ppm. Hasil pengkajian ini menunjukkan bahwa validasi metode uji kadar diklazuril dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol memberikan hasil presisi, akurasi, linearitas yang baik, serta metode ini bisa spesifik membedakan diklazuril dengan zat lain, memiliki batas deteksi 0,480 ppm, dan batas kuantitasi 1,601 ppm. Oleh sebab itu dapat disimpulkan metode ini dapat digunakan untuk menguji kadar sediaan diklazuril serbuk tunggal dan pengujian rutinitas terhadap mutu sediaan diklazuril serbuk tunggal karena memiliki validitas yang baik.

Kata kunci: metode, validasi, kadar, diklazuril

ABSTRACT

Method validation is a necessity in developing methods to ensure that the methods used provide valid results. The purpose of this study was to validate the test method for the content of single diclazuril powder preparations using a UV / Vis spectrophotometer with solvent of sodium acetate trihydrate in methanol. Validation parameters tested were precision, accuracy, linearity, limit of detection, the limit of quantification, and specificity. The results of precision, accuracy,

linearity, specificity are stated to meet the requirements if: (1) for the precision of the coefficient of variation (CV) testing < CV Horwitz method; (2) accuracy is stated as good if the recovery value is <5% or the recovery range is 90-107%; (3) linearity regression value (r) > 0.99; and (4) is stated specifically if test results showed the chromatogram of other substances differs from chromatogram of diclazuril. The precision test results showed that this method produced good precision with a CV value of 3.06%. Accuracy assessment was determined by obtaining different recovery values and resulted a recovery value of 2.94%. Accuracy tests were performed with three different working standard concentrations (5 ppm, 10 ppm, and 15 ppm) and obtained a recovery value of 97.79% also CV of 2.07%. The linearity of this method obtained a regression value of 0.99. The results of the specification test using toltrazuril showed different chromatogram results than diclazuril. The limit of detection was 0.480 ppm and the limit of quantification limit was 1.601 ppm. This study indicated that the validation method for the content of diclazuril powder by spectrophotometer UV-Vis dissolved in the solvent of sodium acetate trihydrate in methanol generated good precision, accuracy, linearity, and this method can specifically distinguish diclazuril from other substances, has a limit of detection of 0.480 ppm, and a limit of quantification of 1.601 ppm. As this method has a good validity, therefore, it can be used to test the content of single diclazuril powder preparations and routine testing of the quality of single diclazuril powder preparations.

Keywords: method, validation, content, diclazuril

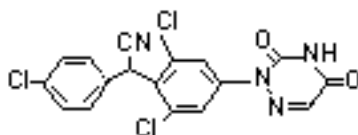
PENDAHULUAN

Balai Besar Pengujian Mutu Obat dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) mempunyai tugas utama antara lain untuk melakukan pengujian mutu obat hewan dan pengembangan metode. Dua tugas ini saling berkorelasi satu sama lain. Sejalan dengan peningkatan jumlah dan jenis obat hewan yang masuk untuk di uji di BBPMSOH maka diperlukan pengembangan metode uji yang cepat dan memberikan hasil yang valid. Sebagai laboratorium uji yang mengacu pada ISO 17025:2017, maka metode yang dikembangkan di BBPMSOH harus divalidasi terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai uji rutin di laboratorium.

Validasi metode adalah proses yang ditetapkan melalui kajian laboratorium bahwa karakteristik kinerja metode tersebut telah memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya ^(7,10). Menurut Hadi (2017) tujuan dari validasi metoda adalah untuk: (1) mendapatkan informasi penting dalam menilai kemampuan sekaligus keterbatasan dari suatu penerapan metode pengujian dan/atau metode kalibrasi, (2) mengidentifikasi aspek kritis dari suatu metode yang harus dikontrol dan dipelihara secara hati-hati, (3) mengetahui sejauh mana penyimpangan yang tidak dapat dihindari dari suatu metode, dan (4) memperkirakan dengan pasti tingkat kepercayaan yang dihasilkan oleh suatu metode pengujian. Adapun parameter atau karakteristik kinerja analitik yang digunakan dalam validasi metode adalah

akurasi, presisi, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, linearitas, rentang, dan ketegaran^(8,10). Pemilihan parameter validasi sangat tergantung dari jenis metode pengujian.

Salah satu obat hewan yang diuji kadarnya di Unit Uji Farmasetik dan Premiks, BBPMSOH adalah diklazuril. Diklazuril merupakan antikoksidia derivatif *benzeneacetonitrile*. Rumus kimia diklazuril adalah *benzeneacetonitrile 2,6-dichloro-a-(4-chlorophenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl)* dengan gambar struktur kimia sebagaimana Gambar 1. Diklazuril adalah antikoksidia yang banyak digunakan pada unggas seperti broiler, kalkun, selain itu diklazuril juga digunakan di domba^(1,5,12).



Gambar 1 Struktur kimia diklazuril

Menurut Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi X⁽⁴⁾ terdapat sepuluh produk obat hewan yang mengandung diklazuril. Semua produk obat hewan guna mendapatkan ijin edar atau nomor registrasi ataupun untuk registrasi ulang harus diuji mutunya di BBPMSOH. Uji mutu ini meliputi uji umum dan khusus. Salah satu uji khusus yang dilakukan untuk obat hewan yang mengandung diklazuril adalah uji kesesuaian kadar sebagaimana yang dicantumkan di label atau pada dokumen registrasi pendaftaran obat hewan di Lampiran A. Uji kadar sediaan diklazuril serbuk tunggal menurut Farmakope Obat Hewan Indonesia (FOHI) Jilid 2 Edisi IV dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)⁽³⁾. Untuk uji menggunakan KCKT diperlukan beberapa bahan seperti dimetilformamid untuk pelarut standar dan sampel, adapun fase gerak diperlukan ammonium format, asam format anhidrat, asetonitril, dan air. Mengingat banyaknya bahan yang digunakan dan perlunya adanya alternatif metode uji kadar jika kolom atau alat KCKT mengalami kerusakan, maka diperlukan suatu metode lain yang dapat digunakan untuk menguji kadar diklazuril.

Beberapa pertimbangan yang digunakan untuk mengembangkan metoda adalah penggunaan bahan uji yang lebih sedikit, waktu pengujian lebih cepat, bahan uji yang digunakan lebih aman bagi penguji, dan lebih mudah dikerjakan. Pengkajian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode uji kadar diklazuril serbuk tunggal dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol menggunakan spektrofotometer UV/Vis.

MATERI DAN METODE

Validasi metode dilaksanakan di Unit Uji Farmasetik dan Premiks-BBPMSOH. Paramater validasi yang diukur adalah akurasi, presisi, linearitas, spesifikasi, limit deteksi, dan limit kuantitasi. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV/Vis (Shimadzu), neraca analitik (Labror), labu ukur 100 mL, labu ukur 50 mL, sentrifus (Kubota), ultrasonikator (Elma), pipet ukur 2 mL, dan cuvet. Bahan yang digunakan adalah *working* standar diklazuril (USP Ref. Standard, USA), sampel obat hewan diklazuril serbuk tunggal dengan komposisi 5 mg/g, metanol p.a. (Merck, *Germany*), dan sodium asetat trihidrat (Merck, *Germany*). Larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol dibuat dengan cara melarutkan 600 mg sodium asetat trihidrat dalam metanol p.a. 100 mL.

1. Metode uji yang divalidasi

Sampel obat hewan yang mengandung diklazuril ditimbang seksama setara dengan diklazuril 2,5 mg kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL. Lima puluh mL larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol dimasukkan ke labu ukur 100 mL, dikocok hingga larut. Sampel dipastikan dulu larut dalam cairan tersebut baru kemudian ditambahkan metanol p.a. hingga 100 mL. Larutan diultrasonikasi selama 15 menit guna memastikan semua sampel terlarut sempurna kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 2 mL filtrat diambil, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, dan diencerkan dengan metanol p.a. hingga 50 mL sehingga didapatkan konsentrasi akhir diklazuril 10 ppm.

Adapun untuk perlakuan standar diklazuril adalah sebagai berikut sebanyak 12,5 mg standar diklazuril dimasukkan dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan 25 mL larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol. Larutan dikocok hingga standar diklazuril terlarut dan kemudian ditambahkan metanol p.a. hingga 50 mL. Jika belum terlarut sempurna, larutan diultrasonikasi selama 15 menit. Sebanyak 2 mL larutan standar diambil, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan metanol p.a. hingga 50 mL sehingga mendapatkan konsentrasi akhir standar diklazuril adalah 10 ppm. Lalu serapan sampel dan standar diklazuril diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang maksimum antara 274,5 – 278,5 nm dan sebagai blanko digunakan metanol p.a. Diklazuril pada sampel dinyatakan identik dengan standar apabila memiliki bentuk kurva kromatogram yang sama serta selisih panjang gelombang maksimum antara sampel dan standar tidak boleh lebih dari 2 nm ⁽¹³⁾. Kadar diklazuril dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Perhitungan kadar diklazuril:

$$\frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{standar}}} \times \frac{C_{\text{Standar}}}{C_{\text{sampel}}} \times 100\% \text{ (rumus 1)}$$

Keterangan:

A = serapan atau absorbansi pada panjang gelombang

C = konsentrasi akhir kandungan diklazuril yang diukur

*= atau dikalikan dengan tingkat kemurnian standar diklazuril yang digunakan

2. Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan dua dari metode berikut:

2.1 Dalam 2,5 g laktosa *dispike* dengan 12,5 mg *working standard* diklazuril kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan 25 mL larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol. Larutan dikocok hingga terlarut kemudian ditambahkan metanol p.a. hingga 50 mL. Larutan kemudian diultrasonikasi selama 15 menit. Sebanyak 2 mL larutan standar diambil, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan metanol p.a. hingga 50 mL. Untuk standar diperlakukan sebagaimana metode yang disampaikan pada Materi dan Metode bagian 1. Serapan hasil *spike* dan standar diklazuril diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang maksimum antara 274,5 – 278,5 nm dan sebagai blanko digunakan metanol p.a. Pengujian kadar perolehan kembali analit diklazuril yang *dispike* ini dilakukan sebanyak 6 kali. Hitung rata-rata dari perolehan *recovery spike working standard* diklazuril dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{Xd}{Xo} \times 100\% \text{ (rumus 2)}$$

$$Xd = Xi - Xo \text{ (rumus 3)}$$

Keterangan :

X_d = selisih kadar pada berbagai penentuan

X_i = hasil analisis

X_o = hasil yang sebenarnya

2.2 *Working standar* diklazuril dengan tiga konsentrasi yang berbeda (5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm) diuji dengan menggunakan metode yang akan divalidasi sebagaimana pada Materi dan Metode bagian 1. Masing-masing konsentrasi diuji ulang sebanyak tiga kali dan kemudian dicari rata-rata perolehan kembali.

Metode uji ini dikatakan memiliki akurasi yang baik apabila memiliki nilai *recovery* < 5% dan nilai perolehan kembali berada antara 90 – 107% ^(2, 7).

3. Uji Presisi

Uji presisi metode dilakukan dengan menguji kadar diklazuril dalam sediaan sampel obat hewan serbuk tunggal yang mengandung diklazuril 5 mg/g. Pengujian dilakukan dengan metode yang divalidasi dan dilakukan pengulangan hingga 7 kali. Kemudian dihitung rata-rata, simpangan baku (*standard deviation*/SD), simpangan baku relatif (*relative standard deviation*/RSD), dan CV dari hasil pengujian. Hasil CV pengujian kemudian dibandingkan dengan nilai CV Horwitz pada 10 ppm.

Metode dinyatakan memiliki presisi yang baik jika (1) uji presisi dilakukan secara rinitabilitas maka CV presisi pengujian harus < CV Hortwitz atau (2) jika dilakukan secara rinitabilitas CV presisi harus < 0,66 x CV Horwitz ^(7,9). CV Horwitz untuk 10 ppm adalah 11,31%, sehingga nilai 0,66 x CV Horwitz adalah 7,47%. Adapun rumus untuk menghitung, RSD, CV, dan CV Horwitz adalah sebagai berikut:

$$RSD = \frac{\delta}{x} \text{ (rumus 4)}$$

$$CV = RSD \times 100\% \text{ (rumus 5)}$$

$$CV \text{ (Horwitz)} = 2^{1-0.5\log C} \text{ (Rumus 6)}$$

Keterangan:

σ = standar deviasi

x = rata-rata

C = konsentrasi sampel saat diukur (10 ppm)

4. Uji Linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan membuat kurva standar diklazuril menggunakan minimal 5 (lima) konsentrasi dengan rentang 80-120% dari konsentrasi yang digunakan untuk pengujian. Konsentrasi standar diklazuril yang digunakan yaitu 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, dan 12 ppm.

Serapan standar diklazuril diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang maksimum antara 274,5 – 278,5 nm dan sebagai blanko digunakan metanol p.a. Kemudian dilakukan perhitungan persamaan garis regresi antara konsentrasi dan serapan standar diklazuril untuk mendapatkan nilai koefisien korelasi (r) diklazuril. Linearitas r dinyatakan baik jika $r \geq 0,99$ ⁽²⁾. Nilai r didapatkan dengan rumus analisis regresi linier sebagai berikut:

$$y = a + bx \text{ (rumus 7)}$$

Keterangan:

$a = \text{intercept}$

$b = \text{slope}$

$x = \text{serapan}$

5. Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

Guna mendapatkan limit deteksi dan limit kuantitasi dari metode yang divalidasi maka dilakukan perhitungan secara statistik melalui garis regresi linear dari uji linearitas dan serapan sampel dari hasil uji presisi. Rumus untuk menghitung limit deteksi dan limit kuantitasi adalah sebagai berikut:

$$\text{Limit deteksi} = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} \text{ (rumus 8)}$$

$$\text{Limit kuantitasi} = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b} \text{ (rumus 9)}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum (Y - y_i)^2}{n - 2} \text{ (rumus 10)}$$

Keterangan :

$S_{y/x}$ = standar deviasi respon analitik dari blanko

b = *slope* / kemiringan dari garis pada persamaan garis

Y = nilai area atau absorbansi pengukuran

y_i = nilai perhitungan kadar dalam rumus persamaan regresi ($y_i = bx + c$)

n = jumlah pengulangan

6. Uji Spesifisitas

Uji spesifisitas metode uji kadar diklazuril dilakukan dengan menggunakan pengecoh *working standard* toltrazuril. Dalam 2,5 g laktosa *dispike* dengan 12,5 mg *working standar* toltrazuril dan kemudian dilakukan pengujian kadar sebagaimana Materi dan Metode Bagian 1. Hasil uji diamati apakah ada perbedaan bentuk kromatogram dan panjang gelombang maksimum dari toltrazuril dibandingkan dengan diklazuril. Metode uji dinyatakan spesifik untuk uji kadar diclazuril apabila hasil kromatogram dan panjang gelombang maksimum toltrazuril berbeda dengan standar ataupun sampel diklazuril.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya atau tingkat kedekatan antara hasil pengujian dengan prosedur yang sedang divalidasi terhadap nilai yang benar ^(7, 10). Untuk mengetahui keakuratan suatu metode uji dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: (1) menggunakan bahan analit yang diketahui kemurniannya, (2) membandingkan hasil analisis dengan prosedur lain yang telah ditetapkan akurasinya, (3) penambahan standar dalam suatu rentang tertentu kedalam plasebo atau jika plasebo tidak didapatkan dapat menambahkannya ke suatu sediaan yang telah diketahui kadarnya, (4) menambahkan cemaran dalam jumlah tertentu kesediaan atau zat aktif, dan (5) menggunakan minimal sembilan penentuan dari tiga tingkat konsentrasi yang berbeda dalam rentang pengujian metode analisis tersebut dan masing-masing konsentrasi tiga kali penetapan ^(2,8,10).

Dalam menguji akurasi dari metode ini dilakukan dua pengujian yaitu dengan menambahkan *working standard* diklazuril pada plasebo berupa laktosa serta dengan menguji kadar *working standard* diklazuril pada tiga konsentrasi yang berbeda masing-masing sebanyak tiga kali. Hasil *recovery* pengujian dengan penambahan atau *spike working standard* diklazuril yang dihitung dengan menggunakan rumus 2 tersaji dalam Tabel 1.

Tabel 1 Hasil *recovery working standard* diklazuril

Pengulangan ke:	% <i>recovery</i>
1	1,49
2	3,27
3	4,74
4	3,16
5	3,32
6	1,68
Rata-rata (%)	2,94

Berdasarkan Tabel 1, hasil nilai *recovery* menunjukkan bahwa metode ini memiliki akurasi yang baik. Hal ini dapat dilihat dari semua keenam pengujian nilai *recovery* tidak ada yang berada lebih dari 5%. Adapun rata-rata *recovery* dari keenam pengujian tersebut adalah 2,94%. Oleh sebab itu, metode ini memiliki akurasi yang baik karena nilai presisi *recovery* < 5%.

Hasil uji akurasi dengan menggunakan tiga konsentrasi diklazuril yang diulang masing-masing tiga kali tersaji dalam Tabel 2. Berdasarkan hasil uji, diperoleh rata-rata perolehan kembali adalah 97,69%. Nilai perolehan kembali dinyatakan baik apabila nilai perolehan kembali berada dalam rentang 90-107% ^(2, 7). Persyaratan 90-107% ini disebabkan karena analit yang terukur berada dalam rentang 5-15 ppm, adapun dalam pengujian rutin metode ini menggunakan konsentrasi akhir analit yang diukur adalah 10 ppm. Oleh sebab itu, berdasarkan uji perolehan kembali dengan menggunakan tiga konsentrasi yang berbeda, maka akurasi

metode uji kadar diklazuril dengan spektrofotometer UV/Vis menggunakan larutan sodium asetat trihidrat dalam metanol memiliki akurasi yang baik.

Berdasarkan hasil pengulangan pengujian untuk uji akurasi dengan menggunakan tiga konsentrasi didapatkan nilai CV akurasi 2,07%. Nilai ini lebih kecil dari nilai CV Horwitz metode uji yang divalidasi. Dengan menggunakan rumus nomor 6 didapatkan nilai CV Horwitz untuk metode uji ini adalah 11,31%. Berkenaan bahwa pengujian validasi ini dilakukan secara ripitabilitas, maka persyaratan CV pengujian dinyatakan baik jika lebih kecil dari $0,66 \times \text{CV Horwitz}$ ^(2, 9). Adapun nilai $0,66 \times \text{CV Horwitz}$ dari metode ini adalah 7,47%, sehingga dengan CV pengujian (2,07%) memenuhi persyaratan karena lebih kecil dari $0,66 \times \text{CV Horwitz}$ metode uji.

Tabel 2 Hasil uji akurasi dengan tiga konsentrasi *working standard* diklazuril

Pengulangan	Kadar <i>working standard</i> diklazuril dalam plasebo	Konsentrasi akhir diklazuril yang diukur	Hasil kadar teruji dalam bentuk %
1	0,75%	15 ppm	98,60
2	0,75%	15 ppm	98,06
3	0,75%	15 ppm	95,62
1	0,50%	10 ppm	102,02
2	0,50%	10 ppm	95,46
3	0,50%	10 ppm	98,42
1	0,25%	5 ppm	96,01
2	0,25%	5 ppm	97,77
3	0,25%	5 ppm	97,26
Rata-rata (%)			97,69
SD			2,02
CV (%)			2,07

2. Uji Presisi

Presisi menurut Kemenkes (2014) adalah tingkat kedekatan diantara hasil uji individu jika prosedur diterapkan berulang kali terhadap sampling ganda atau sampel yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Uji presisi dapat dilaksanakan dengan ripitabilitas, reproduibilitas, ataupun dengan presisi antara ⁽²⁾. Ripitabilitas adalah presisi metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Adapun presisi antara apabila pengujian dilakukan oleh analis yang berbeda dalam waktu yang berbeda akan tetapi dilakukan dalam laboratorium yang sama. Reproduibilitas adalah presisi metode jika dikerjakan pada kondisi beberapa laboratorium yang berbeda ^(2, 7).

Pada uji presisi metode ini menggunakan sampel yang homogen dan telah diketahui kadarnya yaitu diklazuril 5 mg/g. Pengujian dilakukan secara ripitabilitas dengan pengulangan sebanyak 7 kali. Berdasarkan hasil uji presisi, didapatkan nilai CV pengujian adalah 3,06%. Hasil CV pengujian tersebut nilainya lebih kecil dari nilai CV Horwitz yang dilakukan secara ripitabilitas (7,47%). Oleh sebab itu, maka metode uji ini memiliki presisi yang baik. Adapun hasil sebagaimana tersaji dalam Tabel 3.

Tabel 3 Hasil uji presisi diklazuril 0,5%

Pengulangan	Hasil (%)
1	104,78
2	102,44
3	98,46
4	101,58
5	95,09
6	100,78
7	100,84
Rata-rata	100,57
SD	3,08
CV (%)	3,06

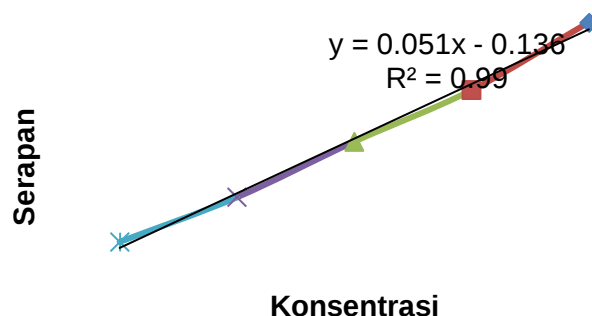
3. Uji Linearitas

Linearitas adalah kemampuan untuk menunjukkan secara langsung atau dengan melalui transformasi matematik yang tepat, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dalam rentang yang diberikan ⁽¹⁰⁾. Menurut ICH (2005) penetapan linearitas dapat dilakukan dengan menggunakan 5 titik konsentrasi standar. Adapun konsentrasi yang digunakan untuk uji linearitas dalam rangka validasi metode pengujian kadar zat aktif dalam suatu sediaan adalah 80-120% dari zat aktif saat pengujian yang dilakukan ^(2, 8). Dalam metode uji ini menggunakan 10 ppm dalam pengujiannya, sehingga untuk uji linearitas digunakan 5 titik konsentrasi yaitu: 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, dan 12 ppm. Berdasarkan hasil uji untuk linearitas didapatkan nilai r adalah 0,99 (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa metode ini memiliki linearitas yang baik karena memenuhi persyaratan bahwa nilai $r \geq 0,99$ ⁽²⁾. Hasil serapan untuk uji linearitas terdapat dalam Tabel 4.

Tabel 4. Konsentrasi dan serapan standar diklazuril

Konsentrasi Diklazuril (ppm)	Serapan
8	0,2792
9	0,321
10	0,3732
11	0,4215

	12	0,4852
<i>Intercept</i>	(-)0,136	
<i>Slope</i>	0,051	
<i>R</i>	0,99	



Gambar 2 Linearitas validasi uji kadar diklazuril

4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi merupakan konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi, tetapi tidak perlu kuantitatif dalam kondisi percobaan yang ditentukan ⁽¹⁰⁾. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Uji batas semata-mata menunjang bahwa konsentrasi analit dibawah atau diatas aras tertentu. Menurut Harmita (2004) batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Adapun batas kuantitasi adalah karakteristik penetapan kuantitatif pada aras rendah dari senyawa dalam matrik sampel atau kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi yang dapat diterima ^(7, 10).

Guna mendapatkan batas deteksi dan batas kuantitasi dari metode uji yang divalidasi maka dilakukan pengujian dengan menggunakan sampel obat hewan yang mengandung diklazuril 5 mg/g dengan pengulangan enam kali. Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung dengan menggunakan rumus no. 8 dan rumus no. 9. Adapun untuk nilai *slope* diambil dari nilai *slope* yang dihasilkan dari uji linearitas. Hasil uji batas deteksi dan batas kuantitasi tersaji dalam Tabel 5.

Tabel 5 Hasil uji batas deteksi dan batas kuantitasi

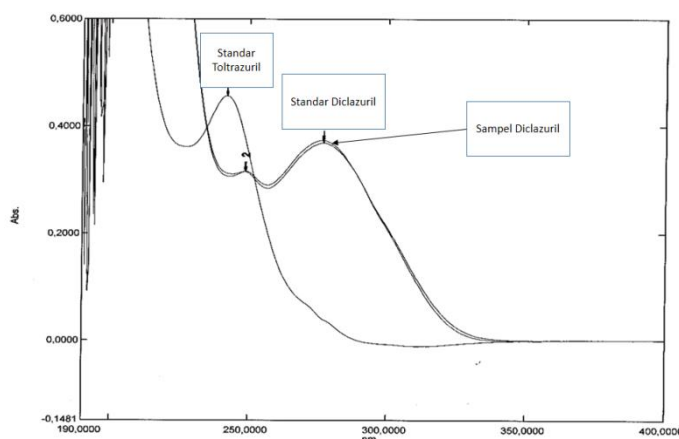
No Sampel	Konsentrasi diklazuril terhitung saat diuji (ppm)	Absorbansi (y)	y_1	$(y-y_1)^2$
1	10,54	0,3934	0,4016	0,000067
2	10,31	0,3846	0,3896	0,000025
3	9,91	0,3772	0,3692	0,000065

4	9,30	0,3472	0,3385	0,000076
5	9,57	0,357	0,3519	0,000026
6	10,14	0,3784	0,3811	0,000007
Jumlah($y-y_1$) ²				0,000267
Jumlah($y-y_1$) ² /(n-2)				0,000067
Simpangan baku residual [akar dari Jumlah/(n-2)] (SDr)				0,008
LOD = 3SDr/b				0,480
LOQ = 10SDr/b				1,601

Berdasarkan hasil uji batas deteksi maka didapatkan batas deteksi untuk metode ini adalah menguji analit diklazuril 0,480 ppm. Meskipun metode mampu menguji diklazuril dalam konsentrasi akhir 0,480 ppm akan tetapi hasil tersebut masih bisa memberikan bias. Adapun untuk batas kuantitasi didapatkan 1,601 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi terendah dari diklazuril pada konsentrasi akhir yang diuji dengan presisi dan akurasi yang baik adalah 1,601 ppm.

5. Uji Spesifisitas

Guna mengetahui spesifisitas dari pengujian ini dilakukan juga pengujian kadar pengecoh yaitu toltrazuril dengan menggunakan metoda uji yang sama dengan diklazuril. Berdasarkan hasil kromatogram didapatkan bentuk kromatogram toltrazuril berbeda dengan standar ataupun sampel diklazuril. Adapun panjang gelombang maksimum dari toltrazuril juga berbeda dengan standar maupun diklazuril. Panjang gelombang masimum standar dan sampel diklazuril adalah 277 nm adapun standar toltrazuril adalah 244 nm sebagaimana terdapat dalam Gambar 3. Hal ini menunjukkan bahwa metode ini dapat membedakan kandungan diklazuril dengan zat lainnya apabila bentuk sediaan obat hewan hanya memiliki satu jenis zat aktif saja.



Gambar 3 Kromatogram standar diklazuril, sampel diklazuril, dan standar toltrazuril

Berdasarkan parameter-parameter validasi yang dilakukan, maka metode uji kadar diklazuril dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol dapat memberikan hasil yang valid. Selain itu metode ini memiliki beberapa keunggulan jika dibandingkan metode uji diklazuril dengan menggunakan KCKT sebagaimana dalam FOHI Jilid 2 Edisi IV ⁽³⁾. Metode ini lebih mudah dan lebih cepat pengerjaannya dibandingkan dengan metode uji yang menggunakan KCKT. Dari sisi penggunaan bahan, metode ini juga hanya menggunakan dua bahan yaitu sodium asetat trihidrat dan metanol p.a. Berbeda dengan pengujian KCKT yang memerlukan lebih dari dua bahan yang digunakan sebagai pelarut dan fase gerak^(3,11). Terlebih dari segi biaya instrumen spektrofotometer UV-Vis relatif lebih murah jika dibandingkan dengan KCKT. Oleh karena itu, biaya operasional pengujian yang dibutuhkan cukup terjangkau, sehingga dapat diterapkan oleh laboratorium yang memiliki keterbatasan dana operasional. Dengan demikian, metode ini dapat digunakan dalam pengujian rutin uji kadar diklazuril tunggal dalam sediaan obat hewan serbuk.

KESIMPULAN

Metode uji kadar diklazuril dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis dengan pelarut sodium asetat trihidrat dalam metanol memiliki presisi, akurasi, linieritas, dan spesifisitas yang baik. Selain itu metode ini memiliki batas deteksi 0,480 ppm dan batas kuantitasi 1,610 ppm. Metode ini telah divalidasi dan dapat memberikan hasil yang valid untuk uji kadar diklazuril serbuk tunggal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Amer M, Amer AM, El-Ghany WAA. 2007. The efficacy of diclazuril (liquid formulation) in the prevention and control of coccidiosis in broiler chickens (semifield and field trials). Terdapat pada https://www.researchgate.net/publication/264348211_The_efficacy_of_diklazuril_liquid_formulation_in_the_prevention_and_control_of_coccidiosis_in_broiler_chickens (diunduh pada tanggal 05 Mei 2020)
2. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia [BPOM]. 2009. Petunjuk Operasional Penerapan Cara Pembuatan Obat yang Baik 2006. ID: Jakarta. Halaman 505-506, 583-592
3. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan [DJKPH]. 2009. Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid II Edisi 4. ID: Jakarta. Halaman 92-94

4. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan [DJPKH]. 2016. Indeks Obat Hewan Indonesia Edisi X. ID: Jakarta. Halaman 183-203
5. *Europe Medicine Agency* [EMA]. 1996. Committee for Veterinary Medicinal Products: Diclazuril Summary Report (1). Terdapat dalam https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/diklazuril-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (diunduh pada tanggal 06 Mei 2020).
6. Hadi A. 2017. Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi ISO/IEC 17025:2017. ID: Jakarta. Halaman 183-195
7. Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* Vol. I (3): 117 - 135
8. International Council of Harmonization [ICH]. 2005. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Terdapat dalam https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1__Guideline.pdf (diunduh pada tanggal 10 Juli 2019)
9. Kantasubrata JJ. 2011. Pelatihan Validasi dan Verifikasi Metode Pengujian, disampaikan dalam pelatihan In House Training Pelatihan Validasi dan Verifikasi Metode Pengujian, kerjasama BBPMSOH dan BSN, 24-25 Oktober 2011.
10. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia [Kemenkes]. 2016. Farmakope Indonesia Edisi V. ID: Jakarta. Halaman 1669-1673
11. Molteni R. 2010. Evaluation on the analytical method – Diclazuril. JRC.DG.D6/CvH/RMO/ag/ARES(2010)916639. EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE, Institute for Reference Materials and Measurements, Community Reference Laboratory for Feed Additives
12. World Health Organization [WHO]. 2001. Diclazuril: WHO Food Additives Series 36. Terdapat dalam <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je07.htm> (diunduh pada tanggal 06 Mei 2020)
13. Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P. 2005. Handbook of Analytical Chemistry: Water, proteins, enzymes, lipids and carbohydrates. ID: New Jersey John Wiley & Sons. Hal 532